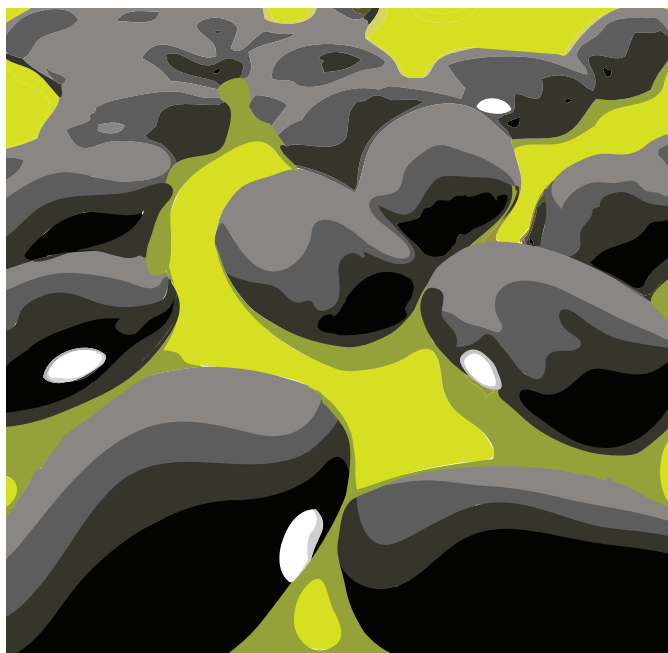


Comunicado 187

Técnico

ISSN 0103 5231
Julho, 2013
Rio de Janeiro, RJ

Ilustração: Caio Lucas de A. de Amaral



Sistema de Detecção Evento Específico para o Feijão GM Embrapa 5.1 Resistente ao Vírus do Mosaico Dourado do Feijoeiro

Edna Maria Morais Oliveira¹
Ivanilda Santos de Lima²
Tatiane Corrêa de Oliveira³

Introdução

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*) ocupa uma área de 12 milhões de hectares e é a leguminosa mais importante para a alimentação de 500 milhões de pessoas na América Latina e África. O Brasil é o maior produtor do mundo com uma produção anual de cerca de dois milhões de toneladas, o que equivale a cerca de 20% da produção mundial. No entanto, a produtividade do feijoeiro é decrescente devido à sua susceptibilidade ao vírus do mosaico dourado (BGMV), que é a doença que mais acomete esta cultura, ocasionando perdas de até 100% quando não há o controle apropriado do inseto vetor (ARAGÃO; VIANNA; RECH, 1998).

O mosaico dourado é encontrado, praticamente, em todas as regiões nas quais o feijão é cultivado e é transmitido pela mosca-branca. A diminuição da produtividade da cultura e da qualidade do produto são resultado de doenças que infectam a planta. Os indicativos de que a planta foi contaminada são: folhas amarelas, indução do nanismo e deformação severa de vagens, com redução do número, tamanho e peso das sementes. Os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da mosca-branca são as

condições climáticas e a disponibilidade de plantas hospedeiras durante todo o ano. Cultivos extensivos de soja e de algodão e o plantio de tomate e de feijão têm favorecido a manutenção de uma elevada população da mosca-branca no campo (ARAGÃO; VIANNA; RECH, 1998).

Diferentes estratégias para controlar tanto o vetor quanto a virose foram pesquisadas no Brasil e em outros países (FARIA, 2000). A obtenção de imunidade ao vírus por melhoramento genético foi a medida de controle mais adequada e eficiente. Neste caso utilizaram-se as sequências genômicas do próprio patógeno (ARAGÃO; VIANNA; RECH, 1998).

Devido à susceptibilidade ao BGMV que esta cultura possui e sua grande importância econômica e social para as regiões onde está estabelecida, a Embrapa Arroz e Feijão e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia desenvolveram um feijão geneticamente modificado (GM) resistente ao BGMV, o evento Embrapa 5.1. Este é o primeiro transgênico resistente ao geminivírus no campo. Para tanto, utilizou-se uma construção de interferência de RNA para o desenvolvimento do evento, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em parceria com

¹ Engenheira Química, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, edna.oliveira@embrapa.br

² Nutricionista, bolsista do CNPq-Brasil, Rio de Janeiro, RJ, ivanildalima@gmail.com

³ Técnica em Alimentos, assistente da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, tatiane.correa@embrapa.br

a Embrapa Arroz e Feijão. Este produto produz um siRNA específico para a indução pós-transcricional do gene silenciando o gene rep viral, resultando em forte resistência ao BGMV (FARIA; CARNEIRO; ARAGÃO, 2010).

A vigilância de organismos geneticamente modificados (OGM) pós-comercialização requer o desenvolvimento de ferramentas para detecção e quantificação para atender à regulamentação vigente no Brasil, que exige a rotulagem de alimentos que contenham até 10 g.kg⁻¹ limiar de OGM. Sendo assim, o método de PCR GM-evento específico, que tem sido a tendência primária para a identificação e quantificação de OGM, devido à sua elevada especificidade com base na sequência flanqueante, foi utilizado para o desenvolvimento do sistema de detecção evento específico para o feijão GM Embrapa 5.1.

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi verificar a eficácia de uma sonda desenvolvida para a detecção de uma sequência de DNA caso específico do feijão GM Embrapa 5.1.

Metodologia

Amostras

As amostras de feijão Embrapa 5.1 e convencional Olathe Pinto foram obtidas da Embrapa Arroz e Feijão, moídas e pesadas em alíquotas de 100 mg para extração do DNA genômico.

Os materiais de referência certificados (MRC) MON 810, Bt 11 e Bt 176 também foram pesados para posterior extração de DNA.

Extração

O DNA genômico foi extraído e isolado através do método CTAB/DNeasy adaptado (DINON et al., 2012), e posteriormente quantificado por espectrometria no UV-VIS a 260 nm.

Curva padrão

Para determinação dos critérios de desempenho foram realizadas diluições das soluções de DNA dos feijões Embrapa 5.1 em solução de DNA de feijão convencional Olathe Pinto nas seguintes concentrações: 0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0%.

PCR quantitativo

As reações de PCR em Tempo Real foram conduzidas no equipamento ABI7000 SDS (Applied Biosystems), cujas condições estabelecidas foram: 10 µL de 1x TaqMan Universal Master mix (Applied Biosystems), 1,0 µL da sonda a 200 nM, 1,0 µL de DNA (nas concentrações da curva padrão) e 8,0 µL de H₂O MilliQ, completando o volume final de 20 µL.

Especificidade da sonda

Para testar a especificidade da sonda, foram conduzidas corridas (PCR em tempo real) usando soluções de DNA de outros eventos transgênicos (MON 810, Bt 11 e Bt 176).

Resultados e Discussão

O isolamento do DNA foi uma etapa bem sucedida para todas as amostras, visto que, em todos os experimentos, foi possível mostrar a capacidade de amplificação do DNA isolado, mesmo que em baixas concentrações.

A curva padrão construída com amostras obtidas por diluição do DNA isolado do feijão Embrapa 5.1 em solução de DNA de feijão convencional estão representadas na Figura 1. A inclinação e o coeficiente de correlação da reta obtida foram de 3,291 e 0,994, respectivamente. A obtenção de uma curva padrão com soluções de DNA como padrões (calibrantes) foi necessária, uma vez que não existe material de referência ou certificado. A sonda apresentou uma alta especificidade para a detecção do alvo, não apresentando amplificação quando empregada em reações com outras espécies (Tabela 1). O método mostrou eficiência adequada (cerca de 100%) para ser utilizado como um sistema de detecção específico do feijoeiro GM Embrapa 5.1.

Tabela 1. Análise da especificidade da sonda desenhada para detecção específica do evento Embrapa 5.1.

Amostras	Ct1	Ct2
Bt 176	ND	ND
MON 810	ND	ND
Bt 11	ND	ND
Olathe Pinto	ND	ND
Embrapa 5.1	24,44	24,58

Ct: ciclo de threshold; ND: não detectado.

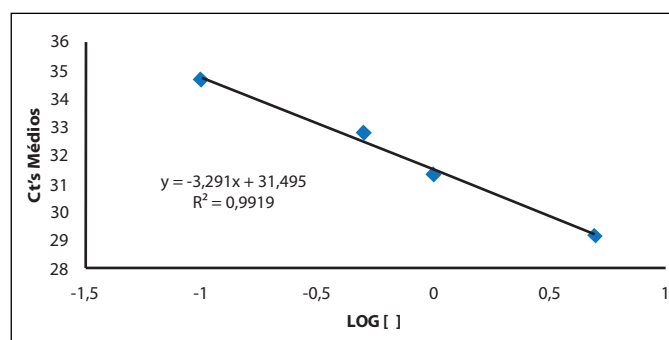


Figura 1. Curva padrão evento específico do feijão Embrapa 5.1. Ct: ciclo de threshold

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram de 0,3 e 0,1% respectivamente. O limite de quantificação foi determinado como a menor concentração que foi passível de detecção e quantificação.

Conclusão

A sonda desenvolvida foi eficiente para detecção do evento feijão GM Embrapa 5.1 visto que os ensaios foram realizados com misturas de soluções de DNA de amostras de feijões convencionais e geneticamente modificados e as reações (PCR) quantitativas apresentaram eficiência média de 99,7%.

Com isso, a técnica de PCR quantitativo em tempo real, utilizando a sonda desenvolvida, mostrou-se capaz de detectar o feijão GM, podendo ser utilizada para atuais e futuras avaliações e para monitoramento do referido evento em todo o mundo.

Referências

ARAGÃO, F. J. L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Feijão transgênico: um produto da engenharia genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, ano 1, n. 5, p. 48-51, mar./abr. 1998.

DINON, A. Z.; BROD, F. C. A.; MELLO, C. S.; OLIVEIRA, E. M. M.; FARIA, J. C.; ARISI, A. C. M. Primers and probes development for specific PCR detection of genetically modified common bean (*Phaseolus vulgaris*) Embrapa 5.1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4672-4677, May 2012.

FARIA, J. C. Historia y situación del cultivo del frijol en los países latino-americanos afectados por geminivirus transmitidos por mosca blanca: Brasil. In: MORALES GARZÓN, F. J. (Ed.). **Bean golden mosaic and other diseases of common bean caused by white fly-transmitted geminiviruses in Latin America**. Cali: Ciat, 2000. p. 9.

FARIA, J. C.; CARNEIRO, G. E. S.; ARAGÃO, F. J. L. Gene flow from transgenic common beans expressing the *bar* gene. **GM Crops**, Texas, v. 1, n. 2, p. 94-98, Mar./Apr. 2010.

Comunicado Técnico, 187

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 3622-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: ctaa.sac@embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2013): tiragem (20 exemplares)

Comitê de Publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta
Membros: André Luis do Nascimento Gomes, Daniela De Grandi Castro Freitas, Leda Maria Fortes Gottschalk, Luciana Sampaio de Araújo, Ilana Felberg, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Torrezan

Expediente

Supervisão editorial: Daniela De Grandi C. Freitas
Revisão de texto: Janine Passos Lima da Silva
Normalização bibliográfica: Luciana S. de Araújo
Editoração eletrônica: André Luis do Nascimento Gomes, Gabriel Gomes de Sousa e Marcos Moulin